

PRODUCTION OF APO LIPOPROTEIN

Reference 4

Patent number: JP63237795
 Publication date: 1988-10-04
 Inventor: KATANO TAMITAKA; others: 02
 Applicant: OTSUKA PHARMACEUT FACTORY INC
 Classification:
 - international: C12P21/02; C12N15/00
 - european:
 Application number: JP19870071146 19870324
 Priority number(s):

[Report a data error here](#)

Abstract of JP63237795

PURPOSE: To permit high-efficient production of apo lipoprotein by transforming the host cells with a plasmid recombinant manifesting the proapo lipoprotein gene, then culturing the transformation.

CONSTITUTION: A plasmid recombinant manifesting lipoprotein gene is prepared by introducing a gene coding human apo A-II into a plasmid vector. Then, host cells are transformed with the recombinant and the recombined cells are cultured to collect human apo-II. The manifestation modes of the gene in the vector and a variety of factors used therefor are not restricted. For example, when *Escherichia coli* is used as the host cells, any systems such as a system directly manifesting in the cell bodies or another system manifesting the secretion in the periplasmic layer can be used.

5' 3'
 DAA GCG
 GTT CGC
 AAA GAA CCG TGC GTA GAA AGC
 TTT CTT GGC ACG CAT CTT TCG
 TTA GTG AGC CAG TAC TTC CAG
 AAT CAC TCG GTC ATG AAG GTC
 ACT GTT ACT GAT TAC GGT AAA
 TGA CAA TGA CTA ATG CCA TTT
 GAC CTG ATG GAA AAA GTT AAA
 CTG GAC TAC CTT TTT CAA TTT
 TCT CCG GAG CTG CAG GCC GAG
 AGA GGC CTC GAC GTC CGG CTC
 GCT AAA TCG TAC TTC GAA AAG
 CGA TTT AGC ATG AAG CTT TTC
 TCC AAA GAA CAA CTG ACA CGG
 AGG TTT CTT GTC GAC TGT GGC
 CTG ATC AAG AAA GCC GGT ACC
 GAC TAG TTC TTT CGG CCA TGG
 GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC
 CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG
 TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT
 ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA
 CAA CCT GCG ACA CAG 3'
 GTT GGA CGC TGT GTC 5'

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

Reference 4

3/13/3

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭63-237795

⑩ Int. Cl.

C 12 P 21/02
C 12 N 15/00
//C 12 P 21/02
C 12 R 1:19

識別記号

厅内整理番号

C-6712-4B
A-8412-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)10月4日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全24頁)

⑭ 発明の名称 アボリボタンパク質の製造法

⑮ 特願 昭62-71146

⑯ 出願 昭62(1987)3月24日

⑰ 発明者 片野 民貴 徳島県徳島市福島1丁目8番53-406号

⑰ 発明者 真島 英司 徳島県鳴門市撫養町大桑島字蛭子山16-23

⑰ 発明者 大貝 秀雄 兵庫県赤穂市有年横尾652-14

⑯ 出願人 株式会社 大塚製薬工場 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115

⑰ 代理人 弁理士 三枝 英二 外2名

明細書

発明の名称 アボリボタンパク質の製造法

特許請求の範囲

① 下記塩基配列を含有するアボリボタンパク質遺伝子をプラスミドベクターに挿入してプロアボリボタンパク質遺伝子発現プラスミド組換体を作成し、該組換体を宿主細胞に形質転換させて形質転換体を構築し、これを培養して発現されるアボリボタンパク質を採取することを特徴とするアボリボタンパク質の製造法。

5'

3'

CAA GCG
GTT CGC
AAA GAA CCG TGC GTA GAA AGC
TTT CTT GGC ACG CAT CTT TCG
TTA GTG AGC CAG TAC TTC CAG
AAT CAC TCG GTC ATG AAG GTC
ACT GTT ACT GAT TAC GGT AAA
TGA CAA TGA CTA ATG CCA TTT
GAC CTG ATG GAA AAA GTT AAA
CTG GAC TAC CTT TTT CAA TTT

TCT CCG GAG CTG CAG GCC GAG
AGA GGC CTC GAC GTC CGG CTC
GCT AAA TCG TAC TTC GAA AAG
CGA TTT AGC ATG AAG CTT TTC
TCC AAA GAA CAA CTG ACA CCG
AGG TTT CTT GTT GAC TGT GGC
CTG ATC AAG AAA GCC GGT ACC
GAC TAG TTC TTT CGG CCA TGG
GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC
CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG
TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT
ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA
CAA CCT GCG ACA CAG 3'
GTT GGA CGC TGT GTC 5'

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は遺伝子工学的手法によるアボリボタンパク質、特にヒトアボA-Ⅱの製造法に関するおり、より詳しくは化学合成したアボリボタンパク質遺伝子を挿入したプラスミド組換体(アボリボタンパク質発現ベクター)で形質転換された形質

特開昭63-237795(2)

転換体の培養による上記タンパク質の製造方法に関する特許。

従来の技術

アボリボタンパク質とは、血漿リボタンパク質より脂質部分を除いたタンパク質部分であって、リボタンパク質の構造と機能を支配する重要な構成タンパク質である。該アボリボタンパク質は脂質を結合して可溶性を保ち、また脂質の運搬に役立つものであり、これには例えばA-I、A-II、B、C-I、C-II、C-III、D、E等が知られている。之等のうちで特にヒトアボA-IIは、ヒトの肝臓、小腸等で合成され、これは下式(A)に示す一次構造のアミノ酸配列(N末端がビロリドンカルボン酸で、C末端がグルタミンであるアミノ酸残基数77個、分子量約8700)を有するポリペプチド鎖が、その6位のシステインでジスルフィド結合した二量体の構造であることが知られている。

が、その特有の生理的機能の詳細はいまだ解明されていない。しかして、該アボA-IIについては、高脂血症患者における血中濃度の増加傾向や、肝疾患(例えば急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝ガン等)患者における有意な血中濃度低下が認められる旨の報告(臨床病理XXIX:2, 135~138(1981))があり、またインスリン作用促進活性を有し、インスリン作用増強剤、ひいては抗糖尿病剤として有用であるとの報告(特開昭61-53222号公報)もあり、之等の病態等に対して何らかの生理的機能を果している。従って、上記アボA-IIを容易に高純度で且つ大量に生産する技術の確立は、その生理的機能の研究、解明等を初めとして、上記各種病態の研究、その治療法の確立等、基礎研究分野、医療分野等の各種分野で非常に意義がある。

発明が解決しようとする問題点

しかして、従来ヒトアボA-IIは、ヒト血清よ

PCA-Ala-Lys-Glu-Pro-Cys-Val-Glu-Ser-
1
Leu-Val-Ser-Gln-Tyr-Phe-Gln-Thr-Val-
10
20
Thr-Asp-Tyr-Gly-Lys-Asp-Leu-Met-Glu-
Lys-Val-Lys-Ser-Pro-Glu-Leu-Gln-Ala-
30
40
Glu-Ala-Lys-Ser-Tyr-Phe-Glu-Lys-Ser-
Lys-Glu-Gln-Leu-Thr-Pro-Leu-Ile-Lys-
50
60
Lys-Ala-Gly-Thr-Glu-Leu-Val-Asn-Phe-
Leu-Ser-Tyr-Phe-Val-Glu-Leu-Gly-Thr-
70
Gln-Pro-Ala-Thr-Gln-COOH (A)

上記式(A)に示すポリペプチド鎖を有するアボA-IIは、血漿中高比重リボタンパク質(HDL)の主要構成タンパクの一つで、アボA-Iと共にHDL中に存在することは知られて

り通常のタンパクの分離、精製手段、例えばヒト血清よりHDL画分を超遠心分離法等により採取した後、脱脂し、ゲル汎過し、イオン交換クロマトグラフィー等を行なって得られているが、かかる方法は、ヒト血清の入手自体困難となりつつある現在、決して実用的に満足なものとはいせず、これに代る新しい方法、特に遺伝子工学的手法を利用して微生物により产生させる方法の確立が、斯界で要望されている。

問題点を解決するための手段

本発明者らは、上記現状に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、上記ヒトアボA-IIをコードする遺伝子を新たに設計し、化学合成することに成功すると共に、かくして得られる遺伝子を適当なプラスミドベクターに組込んで遺伝子組換体(発現ベクター)を構築し、これをを利用して微生物を形質転換し、該形質転換体を培養して目的とするアボA-IIの発現を確認するに成功し、ここに上記斯界

特開昭63-237795(3)

の要望に合致する技術を提供できる本発明を完成するに至った。

本発明によれば、下記式(1)で表わされる塩基配列を含有するアボリボタンパク質遺伝子をプラスミドベクターに挿入してアボリボタンパク質遺伝子発現プラスミド粗換体を作成し、該粗換体を宿主細胞に形質転換させて形質転換体を構築し、これを培養して発現されるアボリボタンパク質を採取することを特徴とするアボリボタンパク質の製造法が提供される。

5'
3' CAA GCG
 GTT CGC
AAA GAA CCG TGC GTA GAA AGC
TTT CTT GGC ACG CAT CTT TCG
TTA GTG AGC CAG TAC TTC CAG
AAT CAC TCG GTC ATG AAG GTC
ACT GTT ACT GAT TAC GGT AAA
TGA CAA TGA CTA ATG CCA TTT
GAC CTG ATG GAA AAA GTT AAA
CTG GAC TAC CTT TTT CAA TTT

び合成、該遺伝子を含む発現ベクターの構築、該ベクターの導入による形質転換体の製造、該形質転換体の培養の順で詳述する。

本発明遺伝子の塩基配列の設計に当たっては、以下の基準を採用した。

- (1) 宿主細胞として用いる、例えば大腸菌での使用頻度の高いトリヌクレオチドコドンを選択する。
- (2) 遺伝子内及びその両端に特定の制限酵素認識部位を持たせ、任意にその部位を操作して、他の遺伝子との連結、プラスミドベクターへの挿入を行ない得るようにする。
- (3) 化学合成した遺伝子断片を集合、連結させる場合、目的とする連結状態とは異なる遺伝子の連結が起こらないか、または最小限に留め得るようにする。
- (4) 前記式(A)に示すアボA-Ⅱ一次構造のN末端ビロリドンカルボン酸に対応するトリ

TCT CCG GAG CTG CAG GCC GAG
AGA GGC CTC GAC GTC CGG CTC
GCT AAA TCG TAC TTC GAA AAG
CGA TTT AGC ATG AAG CTT TTC
TCC AAA GAA CAA CTG ACA CCG
AGG TTT CTT GTT GAC TGT GGC
CTG ATC AAG AAA GCC GGT ACC
GAC TAG TTC TTT CGG CCA TGG
GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC
CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG
TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT
ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA
CAA CCT GCG ACA CAG 3'
GTT GGA CGC TGT GTC 5' (1)

本明細書において、塩基配列、アミノ酸配列、之等を構成する各核酸塩基、アミノ酸乃至その残基等の表示は、IUPAC-IUBの規定乃至当該分野において慣用される略号によるものとする。

以下、本発明のアボリボタンパク質の製造技術につき、これに利用するアボリボタンパク質遺伝子(以下単に「本発明遺伝子」という)の設計及

ヌクレオチドコドンとしては、シャーブラ(C. R. Sharpe et al.)によって決められた遺伝子配列(Nucleic Acids Research, 12(9), 3917-3932 (1984))に習って、グルタミン(Gln)を示すコドンを選択する。

上記基準より設計された本発明遺伝子構成部分の好みしい塩基配列の一具体例は、前記式(1)に示す通りであり、これはヒトアボA-Ⅱのアミノ酸配列に対応するもの、即ち該アミノ酸配列をコードするものである。しかして本発明遺伝子は、ヒトアボA-Ⅱのアミノ酸配列をコードし、遺伝子粗換え技術により該ヒトアボA-Ⅱを発現、製造できる限り、上記式(1)の塩基配列に限定されるものではなく、これを基礎としてその塩基配列の若干の変更、削除、付加等の改変乃至修飾が可能である。かかる改変、修飾等の行なわれた塩基配列もまた、これが上記式(1)の塩基配列と

特開昭63-237795(4)

同一のアボA-Ⅱ遺伝情報を有する限り、本発明遺伝子に包含される。

上記塩基配列の改変乃至修飾は、当業界で知られている。その具体例は、上記(1)の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする遺伝暗号 (genetic codon) の採用にある。

また、上記塩基配列の修飾(付加)には、これにより得られる塩基配列を実際に適当なベクターに挿入し、微生物で発現させるために必要なプロモーター等の各種調節因子との連結を行なうための各種制限酵素認識部位の付与が含まれる。即ち、本発明遺伝子は、これをを利用して遺伝子工学的手法により目的のヒトアボA-Ⅱ発現ベクターを構築するに当たって、アボA-Ⅱ遺伝子に更に、プロモーター、シャイン・ダルガノ配列 (Shine-Dalgarno配列)、SD配列)、タンパク合成の開始コドン、終止コドン等の各種調節因子を適宜

連結させる必要があるが、之等各塩基配列の切断、結合等の操作はいずれも制限酵素の利用により行なわれるため、上記遺伝子には、その前後に適当な制限酵素認識部位の付与が必須となる。

かかる適当な制限酵素認識部位の付与された遺伝子もまた、本発明遺伝子に包含される。その一具体例としては、下記式(2)で表わされるものを例示できる。これは、前記式(1)で表わされる塩基配列の前後に、その発現に必要なプロモーター等の各種調節因子との連結のための特定の制限酵素認識部位を付加したものであり、引続く当該遺伝子発現ベクターの構築に特に好適である。下記式(2)には、該塩基配列中の制限酵素認識部位及び該塩基配列でコードされるアミノ酸配列を併記する。

5'	AAI-TCC-ATG	Ala	Lys	Ser	Tyr	Phe	Glu	Lys
	GGG-TAC	GCT	AAA	TCG	TAC	TTC	GAA	AAG
	EcoRI	CGA	TTT	AGC	ATG	AAG	CTT	TTC
	NcoI							
GCG	GTG	GTT	AGA	CGT	Gln	Ala		
ICGC	GAC	CAA	TGT	GCA	CAA	GCG		
HaeII			AatII		GTT	CGC		
Lys	Glu	Pro	Cys	Val	Glu	Ser		
AAA	TTC	GGC	TGC	GTA	GAA	AGC		
TTT	CTT	GGC	ACG	CAT	CTT	TCG		
Leu	Val	Ser	Gln	Tyr	Phe	Gln		
TTA	GTG	AGC	CAG	TAC	TTC	CAG		
ATAT	CAC	TCG	GTC	ATG	AAG	GTC		
HindIII			ScaI					
Thr	Val	Thr	Asp	Tyr	Gly	Lys		
ACT	GTT	ACT	GAT	TAC	GGT	AAA		
TGA	CAA	TGA	CTA	ATG	CCA	TTT		
Asp	Leu	Met	Glu	Lys	Val	Lys		
GAC	CTG	ATG	GAA	AAA	GTT	AAA		
CTG	GAC	TAC	CTT	TTT	CAA	TTT		
Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Ala	Glu		
TCT	CCG	GAG	CTG	CAI	GCC	GAG		
AGA	GGC	CTC	GAC	GTC	CGG	CTC		
PstI			HaeIII					
					GCG	C	5'	
								(2)
					MluI			

尚、本発明遺伝子中に存在させるべき制限酵素認識部位は、上記式(2)に示すものに限定されることなく、構築すべきアボA-Ⅱ発現ベクターの種類に応じて、従来より公知の各種のものを適宜選択することができる。

上記式(1)及び式(2)で表わされる特定の塩基配列を有する遺伝子を代表として、本発明遺伝子は、之等の塩基配列に従い、各核酸を順次反応させることにより合成できる。この反応は通常の方法、例えば固相リン酸トリエステル法(Nature, 310, 105 (1984))等により行ない得る。また、得られる各塩基配列の単離精製は、例えば高速液体クロマトグラフィー等の常法に従うことができ、精製された各塩基配列の確認は、例えばホモクロマトグラフィーによる二次元展開法(E. Jay, R. A. Bambara, R. Padmanbhan and R. Wu, Nucleic Acids Res., 1, 331 (1974))やマキサム-ギ

15を合成する。之等各オリゴヌクレオチド断片の塩基数及び塩基配列は下記第1表に示す通りである。

特開昭63-237795(5)

ルバート法(A. M. Maxam and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 560 (1977); A. M. Maxam and W. Gilbert, Methods in Enzymol., Vol. 65, pp 499, Acad. Press (1980))等により、それを行なうことができる。

本発明遺伝子の合成は、特に好ましくは前記式(1)又は式(2)に示される塩基配列の中間に位置するPstI制限酵素認識部位で、該塩基配列を前半部(サブユニットA)と後半部(サブユニットB)の2つに分け、之等を別々に構築することにより実施される。この方法につき、以下に詳述する。

この方法においては、まずサブユニットAを合成するために、塩基数16~19個のオリゴヌクレオチド断片A-1~A-15を合成する。またサブユニットBの合成のために、塩基数14~19個のオリゴヌクレオチド断片B-1~B-15を合成する。

第1表

名 称	鎖 長	塩 基 配 列
A-1	16mer	5' AATTCCATGGCGCTGG 3'
A-2	16mer	TTAGACGTCAAGCGAA
A-3	16mer	AGAACCGTGCCTAGAA
A-4	16mer	AGCTTAGTGAGCCAGT
A-5	16mer	ACTTCCAGACTGTTAC
A-6	16mer	TGATTAACGGTAAAGAC
A-7	16mer	CTGATGGAAAAAGTTA
A-8	16mer	AATCTCCGGAGCTGCA
A-9	19mer	GCTCCGGAGATTAACTTT
A-10	17mer	TTCCATCAGGTCTTAC
A-11	17mer	CGTAATCAGTAACAGT
A-12	16mer	CTGGAAAGTACTGGCTC
A-13	16mer	ACTAAGCTTCTACGC
A-14	17mer	ACGGTTCTTCGCTTGA
A-15	19mer	CGTCTAACCAAGCGCCATGG
B-1	19mer	GGCCGAGGCTAAATCGTAC
B-2	19mer	TTCGAAAAAGTCACAAAGAAC
B-3	19mer	AACTGACACCGCTGATCCA
B-4	19mer	GAAAGCCGGTACCGAGCTG
B-5	19mer	GTTAACCTCCTGTCCTACT
B-6	19mer	TCGTGAAATTAGGCACCTCA
B-7	19mer	ACCTGCGACACAGTAATGA
B-8	14mer	CGCGTCATTACTGT
B-9	19mer	GTCGCAGGTTGAGTGCCTA
B-10	19mer	ATTCCACGAAGTAGGGACAG
B-11	19mer	GAAGTAAACCAAGCTCGGT
B-12	18mer	CCGGCCTTCTTGATCAGC
B-13	19mer	GGTGTCAAGTTGTTCTTGG
B-14	19mer	ACTTTTCGAAAGTACGATT
B-15	14mer	AGCCTCGGCCTGCA

次いで、上記各オリゴヌクレオチド断片の各5個ずつを下記式(3)~(8)に示す通りに集合、連結させて、ブロック1~ブロック6をそれぞれ合成する。

得られるブロック1~ブロック3を集合、連結させることにより、所望のサブユニットAが收得される。同様にブロック4~ブロック6の集合、連結により所望のサブユニットBが收得される。

かくして得られるサブユニットA及びサブユニットBの各塩基配列は、次式(9)及び(10)にそれぞれ示す通りである。

サブユニットAは、その両末端にEcoRI、PstI制限酵素認識部位をそれぞれ有しており、またサブユニットBは、その両末端にPstI、MluI制限酵素認識部位をそれぞれ有している。

特開昭63-237795(6)

ブロック 1:
 ← A-1 → ← A-2
 5' ATTCCATGGCGCTGGTTAGACGTCAG
 3' GGTACCGCGACCAATCTGCAGTTC
 ← A-15 → ←

→ ← A-3
 CGAAAGAACCGTGCAGTAGAA
 GCTTTCTTGCA
 ← A-14 → (3)

ブロック 2:
 ← A-4 → ← A-5
 5' AGCTTAGTGGCCAGTACT
 3' CGCATCTTCGAATCACTCGGTATGAA
 ← A-13 → ← A-12

→ ← A-6 → ← A-7
 CCAGACTGTTAC
 GGTCTGACAATGACTAATGC
 ← A-11 → (4)

ブロック 3:
 ← A-8 → ← A-9
 5' TGATTACGGTAAAGACCTGATGGAAAAA
 3' CATTCTGGACTACCTTTT
 ← A-10 → ←

→ ← A-11 → ← A-12
 GTTAAATCTCCGGAGCTGCA
 CAATTAGAGGCCTCG
 ← A-9 → (5)

ブロック 4:
 ← B-1 → ← B-2
 5' GGCGGAGGGCTAAATCGTACTTCGA
 3' ACGTCCGGCTCCGATTTAGCATGAAGCT
 ← B-15 → ← B-14
 ← B-3 → ← B-4
 AAAGTCCAAAGAAC
 TTTCAAGTTCTGTGACTGTGG
 ← B-13 → (6)

ブロック 5:
 ← B-5 → ← B-6
 5' AACTGACACCGCTGATCAAGAAAGCCGG
 3' CGACTAGTTCTTCGGCC
 ← B-12 → ← B-11
 ← B-7 → ← B-8
 TACCGAGCTGGTTAACTTCCTGTCCTACT
 ATGGCTGACCAATTGAAG
 ← B-11 → (7)

ブロック 6:
 ← B-9 → ← B-10
 5' TCGTGGAAATTAGGCAC
 3' GACAGGATGAAGCACCTTAATCCGTGAG
 ← B-10 → ← B-9
 ← B-7 → ← B-8
 AACCTGGCGACACAGTAATGA
 TTGGACGGCTGTGTCATTACTGCGC
 ← B-9 → ← B-8 → (8)

サブユニット A:

5'	AAT	TCC	ATG
3'	GG	TAC	
GCG	CTG	GTT	AGA
CGC	GAC	CAA	TCT
AAA	GAA	CCG	TGC
TTT	CTT	GGC	ACG
TTA	GTG	AGC	CAG
AAT	CAC	TCG	GTC
ACT	GTT	ACT	GAT
TGA	CAA	TGA	CTA
GAC	CTG	ATG	GAA
TCT	CCG	GAG	CTG
AGA	GGC	CTC	G

 3' 5' (9)

サブユニット B:

5'	G	GCC	GAG
3'	AC	GTC	CGG
GCT	AAA	TCG	TAC
CGA	TTT	AGC	ATG
TCC	AAA	GAA	CTG
AGG	TTT	CTT	GTT
CTG	ATC	AAG	AAA
GAC	TAG	TTC	TTT

 3' 5' (10)

GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC
 CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG
 TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT
 ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA
 CAA CCT GCG ACA CAG TAA TGA
 GTT GGA CGC TGT GTC ATT ACT
 GCG C ^{3'}
 (10) 5'

かくして構築されたサブユニットAは、これを見ればプラスミドベクターpBR322のEcoRI-PstI制限酵素切断サイトに容易に組込むことができる。このサブユニットAを組込んで構築したプラスミド組換体の具体例としては、後記実例に示すプラスミドpAPO1を例示できる。

また、サブユニットBは、見ればプラスミドpBR322のEcoRI切断部位に予めMluIリシンカ（化学合成オリゴヌクレオチド：GTCGACGCGTCGAC）を挿入したベクターpBR322-MluI-PstI-MluI制限酵素切

また上記pAPO1及びpAPO2と同様にこれを例れば大腸菌等の適当な宿主細胞に形質転換させることができ、該微生物内で安定に保存、増殖させ得る。

上記のことくして得られる各プラスミドベクターが、宿主細胞中に存在することの確認は、通常の方法、見ればアルカリ-SDS抽出法(Birnboim, H. C. and Doly, J., Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979))等に従って、プラスミドDNAを分取後、種々の制限酵素で処理し、之等制限酵素の認識部位の存在の有無乃至は生成DNA断片の長さの検討を行なうことにより判断できる。

上記本発明遺伝子を保有するベクターは、これを導入して得られる形質転換体が、目的とするアボA-IIを発現するためには、本発明遺伝子と共に、その発現のための各種調節因子、見ればプロモーター、SD配列、翻訳停止シグナル、転写終

特開昭63-237795(7)

断サイトに、上記サブユニットAと同様にして容易に組込むことができる。かくして得られる組換体の具体例としては、後記実施例に示すプラスミドpAPO2を例示できる。

上記各プラスミドは、各々カルシウム法(E. Lederberg, S. Cohen, J. Bacteriol., 119, 1072 (1974))等の通常の方法に従い、之等を大腸菌に形質転換させることができ、この方法によりそれぞれ保存、増幅させることができる。

本発明遺伝子を保有するベクターは、上記プラスミドpAPO1及びpAPO2より、それらの各々保有する各サブユニットを切出し、連結させ、この連結物をプラスミドベクターpBR322等の適当なベクターに組込むことにより得られる。その具体例は後記実施例に示す通りであり、以下、かくして得られるプラスミド組換体を、pAPOA-IIという。このプラスミドpAPOA-IIも

結信号等を保有する必要がある。之等を保有するベクターにおける本発明遺伝子の発現様式及びそのために用いられる各種調節因子は、特に限定はなく、見れば大腸菌を宿主細胞として利用する場合、その菌体内に直接発現させる系、ペリプラスム菌に分泌発現させる系等を任意に採用できる。

上記各発現系の構築等の際に用いられる遺伝子工学的手法は、いずれも常法に従うことができ、各種制限酵素によるDNAの切断処理、S1ヌクレアーゼ、T4DNAリガーゼ等を用いたDNAの連結処理、アガロースゲル電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等によるDNAの単離、精製、フェノール抽出法によるDNAの回収、精製等を包含する。また得られる各発現系の確認も常法に従い、見れば遺伝子の塩基配列を直接マキサム-ギルバート法で解析するか、ミニプレバレーションやマッピング法により遺伝子の挿入やその方向を確認する方法(H. C. Birnboim et

al., Nucleic Acids Research, 7, 1513-1523 (1979) 等によることができる。之等各操作の具体例は、後記実施例に詳述する。

上記大腸菌ベリプラズム層への分泌発現系につき詳述すれば、この発現系は、例えば大腸菌 β -ラクタマーゼのシグナルペプチドを利用して構築されるものであり、この系では、目的タンパク質はシグナルペプチドとの融合タンパクとして大腸菌内で発現され、該シグナルペプチドの作用により内膜まで移行され、該内膜内で融合タンパクよりシグナルペプチドがシグナルペプチダーゼにより酵素的に切断され、かくして目的タンパクのみが大腸菌ベリプラズム層に選択的に蓄積される。従って、この系の利用によれば、大腸菌菌体内におけるプロテアーゼによる目的タンパク質の分解の危険性を回避できる利点があると共に、目的タンパク質はベリプラズム層に局在するため、その

(23番目のA1a)の第3コドンの直後にNaeI制限酵素認識部位を設けたベクターpKTNを構築し、該ベクターのEcoRI-NaeI制限酵素切断断片、pUGT150S(特願昭61-31415号)のEcoRI-XbaI制限酵素切断片及びpAPOA-II由来のプロアポA-II遺伝子を含む塩基配列を連結させることにより構築される。かくして得られる発現ベクターpSAP-Oは、tacプロモーター、SD配列、blaシグナルペプチドーアポA-II融合タンパクをコードする遺伝子が同一方向に並んだ塩基配列を有している。殊に該塩基配列中の融合タンパクをコードする遺伝子は、blaシグナルペプチドをコードする塩基の後にアポA-II遺伝子の第1番目のアミノ酸をコードする第1コドンが直結されているため、読み取りフレームがずれるおそれもなく、tacプロモーターの働きにより目的とする融合タンパクが大腸菌菌体内で発現され、内膜を通過後、ベ

特開昭63-237795(8)

分離、精製が容易となる利点があり、更に内膜に移行した融合タンパクはシグナルペプチドの直後、即ち目的タンパクの直前でシグナルペプチダーゼにより選択的に切断され、結果として他のいかなる不要アミノ酸配列をも含まない目的的タンパクのみがベリプラズム層に分泌、蓄積される利点もある。

上記 β -ラクタマーゼ(bla)のシグナルペプチドを利用した分泌発現系の具体例としては、後記実施例に示したプラスミドpSAP-Oを例示できる。これは、tacプロモーター、SD配列及びblaシグナルペプチド(23個のアミノ酸よりなる)をコードする塩基配列が、同一方向に並んだ塩基配列を有するプラスミドベクターpUGT150(特願昭61-153783号)を起源として、まずそのblaシグナルペプチドC末端部に化学合成リンカー[CCGGCCGG]を挿入して上記blaシグナルペプチドのC末端アミノ酸

リプラズム層に所望のアポA-IIのみが分泌、蓄積される。

上記発現ベクターで形質転換される宿主細胞としては、例えば大腸菌等のグラム陰性菌、枯草菌等のグラム陽性菌、放線菌等の原核生物細胞及び酵母等の真核生物細胞を例示できる。之等の内では特に大腸菌が好適である。その具体例としては、例えば大腸菌K12株由来のHB101株(H. W. Boyer and D. Roulland-Dussoix, J. Mol. Biol., 41, 459-472 (1969))及びJM103株(J. Messing et al., Nucleic Acids Res., 9, 309 (1981))等を例示できる。

上記により得られる発現ベクターで形質転換された宿主細胞の培養は、通常の細胞培養用培地を用いて行なうことができる。上記培地としては、例えばL-broth培地のほか、E培地、M9培地、M63培地等の各種のものを利用できる。之等の

培地には、更に通常知られている各種の栄養を添加することもできる。培養条件としては、微生物の生育に適したpH、温度、通気、搅拌条件等を適宜選択して採用できる。例えば大腸菌の場合は、pH約5~8の範囲、特に約7が適当であり、約20~43℃の温度で、通気搅拌培養すればよい。この培養により、目的タンパク質はペリプラズム層に生産、蓄積される。

かくして生産された目的タンパク質は、これを常法に従い分離、精製できる。この分離、精製操作としては、例えば培養上澄、浸透圧ショック法等により調製したペリプラズム画分、超音波破碎等により調製した細胞内画分等の各々について、それぞれゲル沪過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等が単独で又は適宜組合せて採用できる。

また精製された目的タンパク質の確認は、高速

用いた。反応温度は37℃とし、温浴中で3時間静置して反応させた。制限酵素の標準的使用量は、DNA 1μgに対して1ユニットであり、最終反応液量は100μl以上となるようにした。また反応容器としては試験管の1.5ml容エッペンドルフチューブを用いた。

2. フェノール抽出法

酵素反応の終了後、酵素を失活させ反応を停止するためにこのフェノール抽出法を行なつた。即ち、反応液に、その液量の半量となるTE緩衝液飽和フェノール [1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸(pH8.0)緩衝液をフェノールに飽和させたもの]を加えて充分振盪搅拌し、次いで遠心分離(12000回転/分、5分間)してDNAの含まれる水層を採取し、更に同量のエーテルを加え、同様に振盪搅拌後、遠心分離して水層を採取した。この操作を2~3回繰返した。採取された水層に0.1倍容量の3M酢酸ナトリ

特開昭63-237795(9)

液体クロマトグラフィーによる単一ピークの出現、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による単一バンドの出現等により行ない得る。更に目的タンパク質の同定は、通常のタンパク質乃至ポリペプチドの構造解析手段と同様にして、例えばSDS-PAGEによる分子量の分析、アミノ酸分析器によるアミノ酸組成の測定、アミノ酸シーカンサーによるアミノ酸配列の解析等により行なうことができる。

実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するため参考例及び実施例を挙げる。尚、各例において用いられる各方法及び操作は、特に明記しない限り、以下の通り行なわれたものである。

1. 制限酵素によるDNAの切断操作

使用した制限酵素は、宝酒造社製又はNEB(New England Biolabs)社製のものであり、反応溶液としては同各社が指定する組成のものを

ウム緩衝液(pH4.8)と2.5倍容量の冷エタノールを加え、振盪搅拌し、-80℃で30分以上放置後、遠心分離(12000回転/分、5分間)することによりDNAを沈殿させて回収した。

3. DNAのプラントエンド化方法

(1) T4DNAポリメラーゼによる方法

6.7mMトリス塩酸(pH8.8)、6.7mM塩化マグネシウム、10mM 2-メルカプトエタノール、16.6mM硫酸アンモニウム、6.7μM EDTA及び各1mMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む水溶液中にDNAを溶かし、DNA 1μgに対して1ユニットとなる量のT4DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加え、37℃で1時間反応させた。最終反応液量は100μlとした。反応終了後、前記フェノール抽出法にてDNAを回収した。

(2) S1ヌクレアーゼによる方法

3.0 mM酢酸ナトリウム (pH 4.6)、5.0 mM塩化ナトリウム及び1 mM硫酸亜鉛を含む水溶液にDNAを溶かし、DNA 1 μgに対して3ユニークとなる量のS1ヌクレアーゼ (BR L社製)を加えて、37°Cで10分間反応させた。最終反応液量は100 μlとした。次いで0.5 M EDTA 2 μl及び1 Mトリス塩酸 (pH 8.0) 1 μlを加えて反応を終了させ、その後、前記フェノール抽出法にてDNAを回収した。

4. T4 DNAリガーゼによるDNA断片の結合操作

6.7 mMトリス塩酸 (pH 7.6)、6.7 mM塩化マグネシウム、10 mMジチオスレイトール及び1 mM ATPを含む水溶液にDNAを溶かし、DNA 1 μgに対して1ユニークとなる量のT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製)を加え、12°Cで5時間以上又は4°Cで一晩以上反応させることによりDNAを結合させた。最終反応液量

は0.5 mlに懸濁させた。この懸濁液0.2 mlにT4 DNAリガーゼを用いて結合させたDNAの反応組成液を加え、30分間氷冷した。次いで、42.5°Cの温浴で30秒間加温し、L-broth培地1.0 mlを加え、これを37°Cの温浴中で1時間静置した。

かくして、得られる形質転換株を以下の抗生素耐性を指標として選択した。即ち、1.5%寒天を含むL-broth培地にアンビシリン5.0 μg/ml又はテトラサイクリン20 μg/mlを添加して調製した平板培地に、上記で得た反応組成液の溶液各0.2 mlずつを拡げ、これを37°Cで一晩静置培養し、生育するコロニーを分離した。

6. プラスミドの単離、精製

プラスミドを保有する菌株を、アンビシリン5.0 μg/ml又はテトラサイクリン20 μg/mlを添加したL-broth培地400 ml中で、37°Cで12~16時間振盪培養した。これを遠心分離

特開昭63-237795(10)

は100 mlとした。反応終了後、前記フェノール抽出法にてDNAを回収した。

5. 形質転換法

宿主細胞として、大腸菌HB101株又はJM103株を用いた。

宿主細胞株を、L-broth培地 (1%バクトリpton、0.5%バクトイーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム) で、37°C下、610 nmの吸光度が0.25になるまで振盪培養して増殖させた。この培養液10 mlを遠心分離 (7000回転/分、5分間) して菌体を回収し、氷冷した。これを0.1M塩化マグネシウム5 mlに懸濁させて洗浄し、続いて遠心分離 (7000回転/分、1分間) により菌体を回収し、氷冷した0.1M塩化カルシウム及び0.05M塩化マグネシウム混合溶液5 mlに懸濁させた。これを氷中で30分以上放置した後、遠心分離 (7000回転/分、1分間) して菌体を回収し、再度同溶

(6000回転/分、10分間) して菌体を集め、これに溶液I [50 mMグルコース、10 mM EDTA、2.5 mMトリス塩酸 (pH 8.0) 及び2 mg/mlリゾチーム、滅菌後使用] の14 mlを加えて懸濁させ、氷中に30分間放置した。更にこれに溶液II [0.2 N水酸化ナトリウム及び1%ソジウムドデシル硫酸] の28 mlを加えて攪拌し、氷中で5分間放置した後、溶液III [3 M酢酸ナトリウム (pH 4.8)、滅菌後使用] の21 mlを加えて、氷中で60分以上放置した。遠心分離 (8000回転/分、10分間) して、上清を集め、2.5倍容量 (150 ml) の冷エタノールを加え、-80°Cで30分間放置し、更に遠心分離 (8000回転/分、10分間) して沈渣を得た。これに溶液IV [0.1 M酢酸ナトリウム及び0.05 Mトリス塩酸 (pH 8.0)] の11 mlを加えて溶解させ、更に2.5倍容量 (27.5 ml) の冷エタノールを加え、-80°Cで30分間

放置した。もう一度遠心分離（12000回転／分、15分間）して沈渣を集めた。

次に、得られた沈渣にTE緩衝液[10mMトリス塩酸（pH7.5）及び1mM EDTAの溶液]を4ml加えて溶解させ、これに塩化セシウム4.62gを加えて攪拌溶解させ、更にエチジウムプロマイド5mg/ml溶液を0.42ml加えた。得られた溶液を遠心分離（3000回転／分、10分）して浮遊物を除き、溶液を超遠心分離（50000回転／分、15時間）した。

上記超遠心分離終了後、紫外線照射により螢光を発するプラスミドDNA部分を採取した。これを5M塩化ナトリウム溶液で飽和したイソプロパノールで5～6回抽出し、これからエチジウムプロマイドを除去した。最後にバイオゲルA-50（Biogel A-50）カラムクロマトグラフィー[2.5cm直径×15～20cmカラムサイズ、溶出浴媒=TE緩衝液+0.5M塩化ナトリウム溶

液、UV₂₅₄ nmにより検出]により塩化セシウム及び混入しているRNA等を除去し、前記フェノール抽出法によりプラスミドDNAを回収した。得られた精製プラスミドDNA量は、OD₂₆₀ nm測定によるOD₂₆₀ = 0.022を1μg/ml DNA量と換算して、算出した。

7. オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドの合成は、固相リソソチルエステル法により行なつた（H. Ito et al., Nucleic Acids Research, 10, 1755-1769 (1982)）。

即ち、まず1%架橋ポリスチレン樹脂S-X1（200～400メッシュ、バイオラボラトリーズ社製）をアミノメチル化したものと、5'-O-ジメドキシトリチルヌクレオシドのモノコハク酸エステルとを反応させて、ヌクレオシド担持樹脂を得た。次に、バーチエム社製DNA合成装置を用いて以下の操作を行なつた。

樹脂をビリジンとアセトニトリルとで洗浄し、固相合成法の1サイクルを終了させた。

以上の操作を繰返して、順次鎖長をのばして、目的の保護基を有するオリゴヌクレオチドを担持した樹脂を得た。

得られた樹脂に、切断剤[テトラメチルグアニウム-2-ビリジンアルドキシメートのビリジン：水（90:10）溶液]を加え40℃で15時間放置した。次に脱脂綿を充填したバストールビベットを用いて沪過し、切離された樹脂を除去した後、沪液を減圧下で濃縮した。この残渣に28%アンモニア水2.5mlを加え、ガラス管（内径8mm×1.0cm）に移し、封管後、50～60℃の温浴中に4時間放置して反応させた。反応終了後、アンモニアを除去し、0.01Mトリエチルアンモニウム-二炭酸塩水溶液2mlを加えて溶解し、エーテルで洗浄した。ここまで操作により、目的のオリゴヌクレオチドは、樹脂から

特開昭63-237795(12)

切断され、5'末端水酸基の保護基(ジメトキシリメチル基)以外のすべての保護基が除去された状態となった。

次に、副反応生成物、遊離した保護基、脱保護剤等を、目的とするオリゴヌクレオチドから効率よく除くために、逆相C₁₈シリカゲル(ウォーターズ社製)を充填したカラム(バイオラッド社製、エコノカラム、内径1cm×30cm)を用いて、粗精製を以下の通り行なった。

このカラムクロマトグラフィーは、5%アセトニトリルの0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液から30%アセトニトリルの同水溶液の勾配溶出浴媒系を用いて、254nmでの吸光度測定により検出し、目的とするフラクションを単離した。かくして集めたフラクションを、減圧下に濃縮し、残渣を高速液体クロマトグラフィー(ポンプ:ウォーターズ社製モデル6000A型及び同社製M-45型、グラジェンター:同社製モデル660

型ソルベントプログラマー、検出器:同社製440型ディテクター)で単一ピークとなるまで分取、精製した。ここで用いたカラムは逆相C₁₈YMC Pack ODS-A-312(山村化学研究所社製、0.6cm直徑×15cm)であり、溶出浴媒としては5%→40%アセトニトリル/0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.2)を用いて勾配溶出させた。

かくして精製されたオリゴヌクレオチドは、その5'末端がまだジメトキシリメチル基で保護されているので、これを80%酢酸水溶液で20分間反応処理し、脱ジメトキシリメチル基化後、再度高速液体クロマトグラフィーにより単一ピークになるまで分取、精製した。このクロマトグラフィーは前記と同一のODS-A-312カラムを用い、5%→15%アセトニトリル/0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.5)で勾配溶出により実施した。

かくして目的の化学合成オリゴヌクレオチド精製物を得た。尚、オリゴヌクレオチドの固相合成法における縮合反応の収率は、各サイクルで脱離させたジメトキシリメチルアルコールの量から換算できる。即ち60%過塩素酸-エタノールの溶液中での500μlにおける吸光度を測定することによりその収率を求め得る。

8. オリゴヌクレオチド塩基配列の分析、確認

化学合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列の分析は、ホモクロマトグラフィーを用いた二次元展開法及びマキサム-ギルバート法により、以下のようにまずオリゴヌクレオチドの5'末端側に³²Pの導入を行なって実施した。

i) 5'末端³²Pの標識化

オリゴヌクレオチド5μg(凍結乾燥品)を、蒸留水100μlに溶解し、この溶液14μlに250mMトリス塩酸(pH7.6)、50mM塩化マグネシウム、10mMスベルミン、

50mMジチオスレイトール、500mM塩化カリウムの混合液12μlを、次いで³²P-A-TP水溶液(アマシャム社製、10μCi/μl)1μl及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)の各1μlをそれぞれ加え、更に蒸留水を加えて全量を60μlとした。これを37℃で1時間反応させ、5'末端を³²Pで標識化した。100℃温浴中に2分間浸漬して反応を停止させた後、全量が5μl程度になるまで濃縮し、次いで20×20cmに切ったDEAE-セルロースプレート(マチエレーナーゲル社製、「Polygram」CEL300 DEAE/HR-2/15)にスポットし、ホモミックスチャータイプⅢ(シグマ社製イーストRNAタイプⅥ100を5M水酸化カリウム水溶液8ml及び水42mlと共に37℃で24時間振りませて分解させた後、1N塩酸で中和し、尿素を7Mとなるように加えて溶解させた後、

特開昭63-237795 (13)

全量を500μlとする。使用時は沪過して用いる]を用いて70~80℃で展開させた。上記展開は、キシレンシアノール、オレンジG及び酸性フクシンの各1%混合水溶液をマーカーとしてスポットし、キシレンシアノールの青色マークーが約10cm程度上がるまで行なった。乾燥後、プレートをポリ塩化ビニリデンフィルムで包み、オートラジオグラムをとった。感光時間は室温で約30分とした。X線フィルムを現像し、³²P-標識されたオリゴヌクレオチドのスポットの位置をトレーシングペーパーに移しとり、これをもとに更にDEAE-セルロースプレート上に印をつけた。印をつけた位置のDEAE-セルロース部分をかき取り、エタノール洗浄後、1Mトリエチルアンモニウム・ニ炭酸塩水溶液で溶出させた。濃縮乾固後、カウントを測定し、2000cpm/μlとなるよう蒸留水を添加して溶解させた。

ム水溶液10μl及び水40μlと共に37℃で48時間振りませて分解させた後、1N塩酸で中和し、尿素を7Mとなるように加えて溶解させた後、全量を500μlとする。使用時は沪過して用いる]を用いて70~80℃で展開させた。展開後、オートラジオグラムをとり、オリゴヌクレオチドの部分分解の状態を調べた。部分分解が確認された反応液2μlを、7M尿素水溶液9.5μlに酢酸5mMとビリジン0.5μlとを加えたもので温らせた酢酸セルロース膜(カールツァイン社製、2.5×36cm)の一端中央部にスポットした。これを酢酸-ビリジン水溶液中で電気泳動させ、オレンジGの色系マークーが1.5cm泳動したところで停止させた。ドライヤーで酢酸セルロース膜を乾燥させ、DEAE-セルロースプレート(20×20cm)の一端から1.5cmの位置に酢酸セルロース膜の下端を合わせて重ねた。更に上からは蒸留水

ii) 二次元ホモクロマトグラフィー・フィンガープリント法

上記i)で得られた5'末端³²P-標識オリゴヌクレオチド溶液を7μlづつ、0.4μl容エッペンドルフチューブ各3本に各々採取し、之等に各々250mMトリス塩酸(pH8.0)及び50mM塩化マグネシウムの水溶液2μlを加え、更に蛇毒フォスフォジエステラーゼ(ベーリンガーマンハイム山之内社製、1.5U/mg/mM)をそれぞれ0.1μg/μl、0.2μg/μl又は0.5μg/μl加え、37℃で30分間反応させた。反応の停止は、5mM EDTAを2μl加えた後、100℃温浴中に2分間浸漬することにより行なった。

上記反応液の一部(3μl)を取って、DEAE-セルロースプレートにスポットし、ホモミックスチャータイプVI[シグマ社製イーストRNAタイプVI 10gを5M水酸化カリウ

で温らせたワットマン3Mペーパー(2.5×20cm)5~6枚を載せ、ガラス板と約2kgの重しを載せて約30分間放置してオリゴヌクレオチド部分分解物をDEAE-セルロースプレート上に移行させた。酢酸セルロース膜、ワットマン3Mペーパー及び重しを除去し、DEAE-セルロースプレートを蒸留水で約10cm展開させた後、ホモミックスチャータイプVIを入れた展開槽に移し、70~80℃で約2時間展開させた。展開後、オートラジオグラムをとり、X線フィルムを現像し、現われるスポットの泳動パターンより解析を行なった。

iii) マキサム-ギルバート法

この方法は、上記i)で得られた5'末端³²P-標識オリゴヌクレオチドを用いて、各塩基をこれに特異的な修飾反応、切断反応を利用して、化学的に分解させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用して、分解物をその切断断片の鎖

特開昭63-237795(14)

長差によって分離し、オートラジオグラムをとり、その泳動バターンより塩基配列を読取る方法である (A. M. Maxam and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 560 (1977))。

上記方法のための分析用キットは市販されており、本方法でもニューイングランドヌクレアーレ社製 (New England Nuclear) のマキサム-ギルバート分析キットを用いた。

化学分解は、同キットのマニュアルを参考にして実施した。電気泳動は $20 \times 60 \text{ cm}$ の 20% ポリアクリルアミドゲル (7M 尿素含有) を用いて行なった。泳動後は、ゲルをポリ塩化ビニリデンフィルムで包み、オートラジオグラムをとった (-80°C、一晩感光)。

9. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル濃度は、0.9% 又は 1.6% とした。アガロース I (同仁化学研究所製)

ヒトアボA-Iの構造遺伝子を含む前記式(2)に示す全塩基配列の構築に際し、まず同塩基配列を 14 ~ 19 鎮長のオリゴヌクレオチド断片 30 個 (A-1 ~ A-15 及び B-1 ~ B-15) に分け、各々の断片を固相リソマトリエステル法にて合成した。

各断片、その塩基鎮長、塩基配列は、前記第1表に示す通りである。

合成された各断片は、二次元ホモクロマトグラフィー・フィンガープリント法及びマキサム-ギルバート法にて、その塩基配列の解析を行なって確認した。

② 合成オリゴヌクレオチドの連結

式(2)に示す全塩基配列の構築を、サブユニット A (オリゴヌクレオチド A-1 ~ A-15) とサブユニット B (オリゴヌクレオチド B-1 ~ B-15) に分けて、別々に実施した。

サブユニット A は、上記全塩基配列の前半部、

を上記各濃度となるように併量し、TBE緩衝液 [0.089M トリスホウ酸、0.002M EDTA を含む] を加えて、加熱溶解させてゲルを作成した。泳動は、ミニゲル電気泳動システム ミュービッド 2 (丸善石油社製) を用い、TBE緩衝液を泳動用緩衝液として用いて行なった。泳動後、0.5 μg/μl カエチジウムプロマイド溶液にゲルを没入し、紫外線照射により蛍光を発する DNA 断片を確認した。ゲルからの DNA の溶出は、目的のバンド部分のゲルをナイフ等で切りとり、透析チューブ (3500 MWカット) にいれ、TE緩衝液を満たし、同ミニゲル電気泳動装置で 30 分間泳動させることにより行なった。上記で溶出された DNA を濃縮乾固後、これに少量の蒸留水を加え、前記フェノール抽出法に従って回収した。

参考例 1 PAPOA-II の構築

① オリゴヌクレオチドの合成

EcoRI 制限酵素認識部位より PstI 制限酵素認識部位までから構成される。また、サブユニット A は、同全塩基配列の後半部、PstI 制限酵素認識部位から MluI 制限酵素認識部位までから構成される。之等の塩基配列は前記式(9)及び式(10)に示す通りである。

上記各サブユニットの構築に当たっては、前述したように、サブユニット A は、これを前記式(3) ~ (5) に示したブロック 1 ~ ブロック 3 に分け、またサブユニット B は、これを前記式(6) ~ (8) に示したブロック 4 ~ ブロック 6 に分け、それぞれ別々に構築した。

上記各ブロック (ブロック 1 ~ ブロック 6) の構築は、以下のようにして実施した。その概略は第1図に示す通りである。図において括弧を付して示した数値は塩基鎮長を示し、各ブロックを示す実線の末端の黒丸印 (ドット) は、5' 末端フォスフェート基を示す。

特開昭63-237795(15)

即ち、まずオリゴヌクレオチド断片の5'末端に³²Pを標識し、これを³²P-DNA溶液とした。但し、オリゴヌクレオチドA-1、A-9、B-1及びB-8は、上記操作を行なわなかつた。各ブロック毎（例えはブロック1の場合、オリゴヌクレオチドA-1、A-2、A-3、A-14及びA-15）に、各々の³²P-DNA溶液1μlをとり、100mM ATP 1μlと、リガーゼ反応緩衝液[660mMトリス塩酸（pH7.6）、66mM塩化マグネシウム、100mMジチオスレイトール溶液]6μlを加え、更に水を加えて、最終反応液量を60μlとし、100℃の温浴中で2分間加熱処理後、自然冷却した。

次に、T4DNAリガーゼ（宝酒造社製）2.5ユニットを添加して、4℃下に一晩反応させた。フェノール抽出後、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、オートラジオ

ニットA及びBの構築を完了した。

③ DAP01及びDAP02の作製

上記②で構築されたサブユニットAをプラスミドベクターpBR322に組込んだベクターをDAP01とし、同サブユニットBを同pBR322に組込んだベクターをDAP02とした。

まずDAP01の構築につき詳述する。

pBR322を制限酵素PstI及びEcoRIで、処理した後、0.9%アガロースゲル電気泳動を行なつて、約3.60kbpのDNA断片（A）を得た。このDNA断片（A）と、サブユニットA、T4DNAリガーゼ、ATP及びリガーゼ反応用緩衝液とを混ぜ、37℃で1時間反応させて、DNAを連結させた。この反応組成液で大腸菌HB101株の形質転換を行ない、得られる形質転換株をL-broth培地にテトラサイクリン20μg/mlを添加した平板培地

グラムをとり、目的の大きさのブロックである二本鎖DNA部分をかき取り、DNAを溶出させた。電気泳動条件は、20×60cm、0.35mm厚さ、1200～1500Vとし、泳動液としてTBE緩衝液を用いた。

以上の操作により、各ブロック1～6を構築した。

次に、得られた各ブロック間の組立てを以下の通り実施した。即ち、上記で溶出させたブロック1～6のそれぞれを液体シンチレーションカウンターにてカウント測定後、5000cpm/μlとなるように水で希釈し、各2μl（サブユニットAはブロック1～3、サブユニットBはブロック4～6）をとり、T4DNAリガーゼ及びATPを加えて連結反応を行なつた。

10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、目的の大きさのサブユニットを分離し、かき取り、溶出させることにより、所望のサブユ

ニットA及びBの構築を完了した。

に抜け、生育してくるコロニーを選択した。更にこのうちの1株を400ml L-broth培地にテトラサイクリン20μg/mlを添加した液体培地にて坂温培養後、プラスミドDNAを単離、精製し、制限酵素HpaII、PstIとEcoRIの二種酵素反応系で処理し、その切断様式をポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した。またマキサム-ギルバート法にて直接塩基配列を解析した。かくして、得られた形質転換株がDAP01、即ち目的のサブユニットAを含有し、設計した塩基配列を有するものであることを確認した。

次に、DAP02の構築につき詳述する。

サブユニットBをプラスミドベクターpBR322に導入するに際し、構築したサブユニットBのC末端側は、MluI制限酵素認識部位となっているが、pBR322は該MluI制限酵素認識部位を有しないため、該サブユニットB

特開昭63-237795(16)

を直接pBR322に組込むことはできない。従って、まずpBR322にMluIリンカーを挿入したベクターpBR322-Mluを以下の通り作製した。即ち、pBR322(10μg DNA)にEcoRIの5ユニットを加え、37℃で2時間反応させ、フェノール抽出法にてDNAを回収し、更に蒸留水で溶解させた後、S1ヌクレアーゼと共に反応させて、pBR322のEcoRI制限酵素認識部位がプラントエンド化状態になったDNA断片を得た。

次に、化学合成したMluIリンカー[5' G T C G A C G C G T C G A C 3']の5'末端にフォスフェートを導入して得たオリゴヌクレオチドを混合し、T4DNAリガーゼを用いて、連結反応させた。

反応後、この反応組成液で大腸菌HB101株を形質転換させ、得られたテトラサイクリン耐性コロニーを選択し、そのうちの1株よりア

ラスミドDNA pBR322-Mluを単離、精製した。

制限酵素EcoRI、MluI、SalI、HinfI等で処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にてその切断パターンを解析し、得られたベクターがpBR322のEcoRI制限酵素認識部位に化学合成MluIリンカーを挿入された目的のものであることを確認した。

次に、このベクターpBR322-Mluを制限酵素PstI及びMluIで処理し、0.9%アガロースゲル電気泳動にて、約3.6kbpのDNA断片(B)を単離、精製した。その後、この断片とサブユニットB、T4DNAリガーゼを混ぜ、37℃で1時間反応させて連結した。これを大腸菌HB101株に形質転換して、目的のpAPO2を得た。

上記で得られたpAPO2は、pAPO1と同様にマキサム-ギルバート法にてその塩基配

列を解析した結果、サブユニットBの存在が確認され、また目的の塩基配列を有していることが確認された。

④ pAPOA-IIの構築

上記③で得たpAPO1を、制限酵素PstI及びEcoRIで処理し、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、約0.13kbpのDNA断片(C)を単離、精製した。

同様にしてpAPO2を、制限酵素PstI及びSalIで処理し、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、約0.14kbpのDNA断片(D)を単離、精製した。

一方、pBR322を制限酵素EcoRI及びSalIで処理し、0.9%アガロースゲル電気泳動法にて約3.71kbpのDNA断片(E)を単離、精製した。

上記で得た3種のDNA断片(C)、(D)及び(E)をT4DNAリガーゼを用いて連結

反応させた。反応物で大腸菌HB101株を形質転換させ、アンビシリン耐性コロニーを選択し、そのうちの1株よりアラスミドDNAを単離、精製した。

かくして、ヒトアボA-II遺伝子をコードする塩基配列を有する化学合成遺伝子が、pBR322のEcoRI及びSalI制限酵素認識部位間に挿入されたプラスミドベクターpAPOA-IIを得た。

得られたベクターpAPOA-IIにつき、種々の制限酵素(例えばHpaII、AatII、HaeII等)による切断パターン、切断部位等を、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した結果、これが全塩基数約3.97kbpのヒトアボA-II構造遺伝子を有する目的のプラスミドpAPOA-IIであることを確認した。

上記③及び④に示したpAPO1、pAPO2及びpAPOA-IIの構築の操作の概略を、

第2図に示す。図において $A \rho'$ はアンビシリン耐性を、 $T C'$ はテトラサイクリン耐性を、それそれ示し、以降の各図においても同様とする。

上記プラスミドベクター $\rho A P O A - II$ を保有する大腸菌 $H B 101$ 株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に「*E.scherichia coli*, $H B - 101$, $\rho A P O A - II - No. 3$ 」なる表示で寄託番号「微工研寄第9165号 (FERM P-9165)」として寄託されている。

参考例2 大腸菌ベリプラズム分泌発現系ベクターの構築

tac プロモーター、 bla シグナルペプチドの下流に化学合成したアボA-Ⅱ遺伝子を導入することにより、大腸菌ベリプラズム層への分泌発現ベクターを得ることができるが、該ベクターの構築に当たっては、 bla シグナルペプチドのアミノ酸配列に対するコドンの流れに沿ってアボA-Ⅱ構

その構築には、 tac プロモーターと bla シグナルペプチドとを保有するプラスミドベクター $\rho U G T 150$ (特願昭61-153783号、これを保有する大腸菌 $J M 103$ 株は微工研条寄第974号として寄託されている)を利用した。

$\rho U G T 150$ の $10 \mu g$ を、制限酵素 $N r u I$ 及び $E c o R I$ で処理し、0.9% アガロースゲル電気泳動にて約 0.46 kbp の DNA 断片 (I) を単離、採取した。

また、 $\rho B R 322$ の $10 \mu g$ を制限酵素 $D r a I$ 及び $E c o R I$ で処理し、1.6% アガロースゲル電気泳動にて、約 3.23 kbp の DNA 断片 (J) を単離、採取した。

上記2種のDNA断片と、化学合成したリンカーリンカー [$5' C C G G C C G G 3'$] $1 \mu g$ を、 $T 4$ DNAリガーゼを用いて連結させ、連結物で大腸菌 $J M 103$ 株を形質転換させ、テ

特開昭63-237795 (17)

造遺伝子のコドンフレームがずれることがないような結合の仕方が要求される。以下、かかる要求を満たした分泌発現系ベクターの構築につき詳述する。

① 中間プラスミドベクター $\rho K T N$ の作製

このベクターの構築操作の概略は、第3図に示す通りであり、該ベクターは、上記要求を満たすために、 bla シグナルペプチドの23番目のアミノ酸 ($A l a$) の第3コドンの後で、制限酵素 $N a e I$ で切断できるように設計された。

尚、第3図において、黒矢印は tac プロモーターを、波線は bla シグナルペプチドをコードする塩基配列を、白ヌキの部分は $E G F$ をコードする塩基配列をそれぞれ示し、之等は以下の図においても同様とする。また、第3図には上記制限酵素 $N a e I$ 認識部位導入部分 (bla シグナルペプチドと合成リンカーとの結合部位) の塩基配列を併記する。

トラサイクリン耐性を示すコロニーを選択し、そのうちの1株からプラスミドDNAを単離、精製して、目的の中間プラスミドベクター $\rho K T N$ を得た。

このベクターは、 bla シグナルペプチド23番目のアミノ酸の直後に、制限酵素 $N a e I$ 認識部位を有するものであった。その切断バターン及び切断部位の存在を確認した。

上記プラスミドベクター $\rho K T N$ を保有する大腸菌 $J M 103$ 株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に「*E.scherichia coli*, $J M - 103$, $\rho K T N - 2-2$ 」なる表示で寄託番号「微工研菌寄第9146号 (FERM P-9146)」として寄託されている。

② $\rho S A P - O$ の作製

このベクターの構築の操作の概略は、第4図に示す通りである。図において、斜線を付して

特開昭63-237795 (18)

示した塩基配列部分はアボA-Ⅱ構造遺伝子を示す。また第4図には、blaシグナルペプチドとアボA-Ⅱ構造遺伝子との結合部位の塩基配列をも併記する。

まず、アボA-Ⅱ遺伝子を有するプラスミドpAPOA-Ⅱの10μgを、制限酵素AatⅡで処理し、次にS1ヌクレアーゼ(DNA 1μgに対して3ユニット)と反応させた後、更に制限酵素SalIで処理し、1.6%アガロースゲル電気泳動にて約0.25 kbpのDNA断片(K)を単離、採取した。これは、アボA-Ⅱの構造遺伝子をコードする塩基配列を持つDNA断片である。

次に、上記①で得たpKTNの5μgを制限酵素EcoRI及びNaeIで処理後、0.9%アガロースゲル電気泳動にて、約0.46 kbpのDNA断片(L)を採取した。

更にプラスミドベクターpUGT150S

上記プラスミドベクターpSAP-0を保有する大腸菌JM103株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に「Escherichia coli, JM-103, pSAP-0-11」なる表示で寄託番号「微工研寄第9147号(FERM P-9147)」として寄託されている。

実施例1 アボA-Ⅱの発現及び確認

① 分泌発現系ベクターpSAP-0を保有する大腸菌JM103株の培養

下記第2表に示す組成の液体培地(M-9カゼミノ酸培地)を用いた。

第2表

成 分	配合量
NaH ₂ PO ₄	5.8g
KH ₂ PO ₄	3.0g
NaCl	5.0g
NH ₄ Cl	1.0g

(特願昭61-31415号、微工研第975号として寄託された大腸菌JM103株に保有される)の5μgを、制限酵素EcoRI及びXbaIで処理した後、1.6%アガロースゲル電気泳動にて、約3.25 kbpのDNA断片を単離、採取した。

上記3種のDNA断片を混ぜ、T4DNAリガーゼを用いて連結反応させ、反応物で大腸菌JM103株を形質転換し、テトラサイクリン耐性コロニーを選択し、そのうちの1株からプラスミドDNAを単離、精製した。

得られたプラスミドDNAにつき、種々の制限酵素(例えばHinc II等)で処理して、その切断パターン、切断部位の存在を検討した結果、該プラスミドはlacプロモーター、blaシグナルペプチドの塩基配列及びアボA-Ⅱ遺伝子を同一方向に連結された塩基配列を有する目的のベクターpSAP-0であることが確認された。

カゼミノ酸(ディフコ社製)	5.0g
ビタミンB ₁	1.0mg
プロリン	50mg
グルコース*	5.0g
1M CaCl ₂ *	0.1ml
1M MgCl ₂ *	1.0ml
テトラサイクリン	20μg/ml

H₂Oを加えて全量を1000mlとする

但し表中の*印は、別途オートクレーブ滅菌処理(121℃で15分間)した試薬を使用したことを示す。

プラスミドベクターを保有する大腸菌JM103株の前培養液1mlを、上記組成のM-9カゼミノ酸培地100mlを含むフラスコに加え、37℃で往復振盪培養した。培養開始後、約4時間(OD₆₁₀ - 約0.4)にて、IPTGを0.1mg/mlとなるように添加し、更に同様にして培養を続けた。

② 菌体からの目的物の抽出

①で示した培養条件で培養し、IPTG添加後5時間で培養を停止させ、集菌（10000回転／分、5分間）した。

得られた菌体より浸透圧ショック法にて、ペリプラズム画分を得た。即ち、培養液と同量の30mMトリス塩酸（pH8.0）-20%シヨウ酸緩衝液を加えて懸濁させた。更に最終濃度0.01MとなるようにEDTA溶液を加え、ロータリーシェーカーで24℃にて180回転／分で10分間振盪攪拌培養した。遠心分離（10000回転／分、5分間）して、菌体を集め、次いで氷冷した水を培養液と同量加えて再懸濁させ、氷中に15分間放置し、時々攪拌した後、遠心分離（10000回転／分、5分間）により、上清液と沈渣とを分離した。得られた上清がペリプラズム画分である。また、沈渣は同量の氷冷した水を加えて懸濁させ、超音

ることにより実施した。かくして得られる抗血清を以下のアッセイに用いた。

また、ベルオキシダーゼ標識アポA-IIを、吉武らの報告しているマレイミド法（S. Yoshitake et al., J. Biochem. 92, 1413-1424 (1982)）に従い、以下の通り作製した。即ち、アポA-IIを、6M尿素の存在下で、還元剤であるジチオスレイトールで処理してS-S結合を切断し、SH基を1ヶ所持つ单量体分子とした。一方、ベルオキシダーゼへのマレイミド基の導入は、モル比で100倍量のN-サクシニミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレートとベルオキシダーゼとを反応させることにより行なった。このマレイミド基導入ベルオキシダーゼを、上記で作製したアポA-II单量体にモル比で1:1になるように加え、4℃で20時間インキュベートした。その後、

特開昭63-237795(19)

波処理（100W、50秒、2回）を行ない、遠心分離（15000回転／分、10分間）して、その上清画分を得た。これを細胞内画分とする。

③ エンザイムイムノアッセイによるアポA-IIの測定

上記②で得られた各画分のアポA-IIの測定は、精製ヒトアポA-IIを標準物質として用いたアポA-II特異エンザイムイムノアッセイにより行なった。以下にその測定法の詳細を示す。

まずヒト血清より精製したアポA-IIを抗原として、家兔に免疫して抗血清を得た。これは、凍結乾燥ヒトアポA-II 1mgを蒸留水1mlに溶解後、フロインド完全アジュバンド1mlを加えて乳化させ、これを家兔3羽の足指皮内に注射し、次に2週間毎に同量の上記乳化アポA-IIを家兔の背部に皮下注射して、合計3回免疫し、最終免疫の7日後に全採血して、血清を分離す

バイオゲルP-100（バイオラッド社製）にてゲル通過を行ない、ベルオキシダーゼアポA-II複合体を含む画分を集めた。

アッセイに用いる抗血清及びベルオキシダーゼ標識アポA-IIの希釈倍率、アッセイ条件を最適化するための反応時間、温度、抗体結合標識抗原（バウンド）と遊離標識抗原（フリー）の分離方法等の検討を行なって、以下の測定条件を設定した。即ち、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.14M塩化ナトリウム及び20mMリン酸緩衝液（pH7.2）を希釈液として用いて、抗ヒトアポA-II血清（1:120）50μl、測定試料又は標準ヒトアポA-II 100μlを試験管に加え、4℃で20時間インキュベートした後、5%（v/v）アフィゲルプロテインA（バイオラッド社製）100μlを加え、攪拌後、室温で1時間静置した。0.05%ツイーン20及び0.14M

特開昭63-237795(20)

塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.2)('PBS-Tw20')という)1mlを加え、3000回転/分で1分間遠心して上清を除去した。この操作を2回繰返すことにより試料中のペルオキシダーゼ活性に影響を及ぼす物質を除くことができた。次にペルオキシダーゼ標識アボA-II 100μg(25ng)を加え、搅拌後、室温で1時間静置した。その後、PBS-Tw20の2mlを加え、3000回転/分で1分間遠心して上清を除いた。この操作を2回繰返して、遊離のペルオキシダーゼ標識アボA-IIを除去した。最後に0.03%過酸化水素及び1mg/ml 4-クロロローフェニレンシアミンを含む0.02Mクエン酸緩衝液(pH6.5)200μlを加え、搅拌した。室温で30分間静置した後、1N硫酸1mlを加え、反応を停止させ、492nmでの吸光度を測定した。標準ヒトアボA-IIより得られた標準

曲線より、試料中のアボA-II免疫活性物の含量を求めた。

④ ヒトアボA-IIの発現量

分泌発現系ベクターを保有する大腸菌形質転換株を、上記②及び③に従い培養後、各画分につき、エンザイムイムノアッセイを行なって、アボA-IIの免疫活性物含量を求めた。

その結果を下記第3表に示す。尚、培養時、遠心分離して得られる上清画分についても、同様の試験を行なったが、この画分には、アボA-IIは、検出されなかった。

第3表

分泌発現系ベクターを保有する大腸菌JM103株

(単位:μg/l)

	ペリプラズム画分	細胞内画分
pSAP-O-11	20.03±0.86	27.38±0.56

実施例1の①に記載のM-9カザミノ酸培地20lを含む30l容ジャーファーメンターにて培養を行なった。

pSAP-Oを保有する大腸菌JM103株を、テトラサイクリン20μg/mlを含むL-broth培地400mlにて、37℃下に一夜培養し、M-9カザミノ酸培地20lに加えた。培養は、200回転/分の搅拌条件下に、20l/分の通気を行ないながら、37℃でpH6.4に制御して行なった。培養開始から4.5時間後に、IPTGを0.3ml/mlになるように添加し、更に2時間同条件下に培養を続けた。

② 菌体からのペリプラズム画分の抽出

上記で得られた培養液20lを、300ml/分の流速で連続的に遠心分離(8000回転/分)して菌体を集めた。その菌体を実施例1の②に記載した浸透圧ショック法に従い処理し

実施例2 発現したアボA-II免疫活性物質の精製

① 分泌発現系ベクターpSAP-Oを保有する大腸菌JM103株の大腸菌

特開昭63-237795 (21)

てベリプラズム画分を抽出した。

③ ベリプラズム画分からの精製

上記ベリプラズム画分を、アボA-IIエンザイムイムノアッセイで測定した結果、総量2.6mg相当のアボA-II免疫活性物が検出された。本ベリプラズム画分抽出液からのアボA-II免疫活性物質の回収は、疎水性クロマトグラフィー、免疫吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行なった。その概略を以下に示す。

即ち、まずベリプラズム画分10gに0.6M濃度となるように硫酸アンモニウムを加え、0.6M硫酸アンモニウムにて平衡化したブチルトヨバルカラム（東洋曹達社製、4×10cm）に流した。0.3M硫酸アンモニウム400mlで洗浄後、蒸留水400mlにてアボA-II免疫活性物質を溶出させた。

次に、抗体結合カラムを用いて免疫吸着クロ

G3000SWカラム（東洋曹達社製、7.5×600mm）を用いてゲル沪過して分画した。

アボA-II免疫活性を示す画分を集め、20mM重炭酸アンモニウム水溶液に対して透析し、凍結乾燥後、コスモシール5C18-300カラム（半井化学社製、4.6×150mm）を用いた逆相クロマトグラフィーにより最終精製を行なった。アセトニトリル40%から60%の直線濃度勾配法により分画し、アボA-II免疫活性のある単一ピーク部分を分取し、凍結乾燥した。

④ 最終精製標品の同定

上記で得られた精製標品を、0.1%ドシル硫酸ナトリウムを含む17.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分析した。その結果、血清より得られたヒトアボA-IIと同じ位置に単一バンドを示した。また、同精製標品に、4N-メタンスルホン酸を加え、130°Cで4

マトグラフィーを実施した。これには抗体結合カラムとして、アフィゲル10（バイオラッド社製）25mlと、実施例1の③に記載した方法で得た抗血清のアーグロプリン画分500mlとを室温で2時間反応させて得られた抗ヒトアボA-II抗体結合ゲルをカラム（2.5×25cm）に充填して利用した。この抗体結合カラムに、上記ブチルトヨバル溶出液を流し、アボA-II免疫活性物質を吸着させた。0.14M塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液（pH7.2）にて洗浄後、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液（pH2.5）にて溶出させた。その溶出液を1MトリスにてpH8.0に調整した後、20mM重炭酸アンモニウム水溶液に對して透析し、凍結乾燥した。

得られた凍結乾燥試料を、0.2M塩化ナトリウムを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.2）に溶解し、同緩衝液で平衡化した

時間、加水分解を行ない、中和後、アミノ酸自動分析計を用いてローフタルアルデヒド法（J. R. Benson, P. E. Hare, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 72, 619 (1975)）により、そのアミノ酸組成の分析を行なった。

結果を下記第4表に示す。尚、上記方法では、プロリン（Pro）及びシスチン（Cys）は検出できない。

第4表

アミノ酸	1分子当たりの残基数	理論値	
		精製標品	ヒトアボA-II
Asp+Asn	7.3	7.4	6
Thr	11.2	10.5	12
Ser	11.7	11.6	12
Glu+Gln	31.4	33.1	32
Pro	検出できず	検出できず	8
Gly	7.9	9.4	6

Ala	11.3	12.3	10
1/2 Cys	検出できず	検出できず	2
Val	11.8	11.7	12
Met	1.8	0.6	2
Ile	2.0	2.1	2
Leu	16.6	16.6	16
Tyr	7.4	7.4	8
Phe	8.0	8.0	8
Lys	17.0	18.2	18
His	0.1	0.0	0
Trp	0.0	0.0	0
Arg	0.3	0.5	0

また、アミノ末端アミノ酸の分析を、ブリュワーラーの方法 (H. B. Brewer, J. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69, 1304-1308 (1972)) に従い決定した。その結果、アミノ末端アミノ酸は、ヒト

カー及びpBR322を利用してプラスミドベクター-pKTNを構築する概略図と共に、得られるpKTNのblaシグナルペプチド-合成リンカーノの結合部位を示す。

第4図はプラスミドベクター-pAPOA-II、同pKTN及びpUGT150を用いて分泌発現系ベクター-pSAP-Oを構築する概略図と共に、得られるベクターのblaシグナルペプチド-アポA-II構造遺伝子の結合部位を示す。

(以上)

代理人 弁理士 三枝英二



特開昭63-237795(22)

アポA-IIと同一のピログルタミン酸であると同定された。

更に、上記方法における回収量は、最終精製標品の280nmにおける吸光度(分子吸光係数E^{1%}_{1cm} = 9.2)から換算して、約300μg蛋白質量であった。

以上の結果より、本発明方法により検出されたアポA-IIは、ヒト血清より得られるアポA-IIと同一物質であることが確認された。

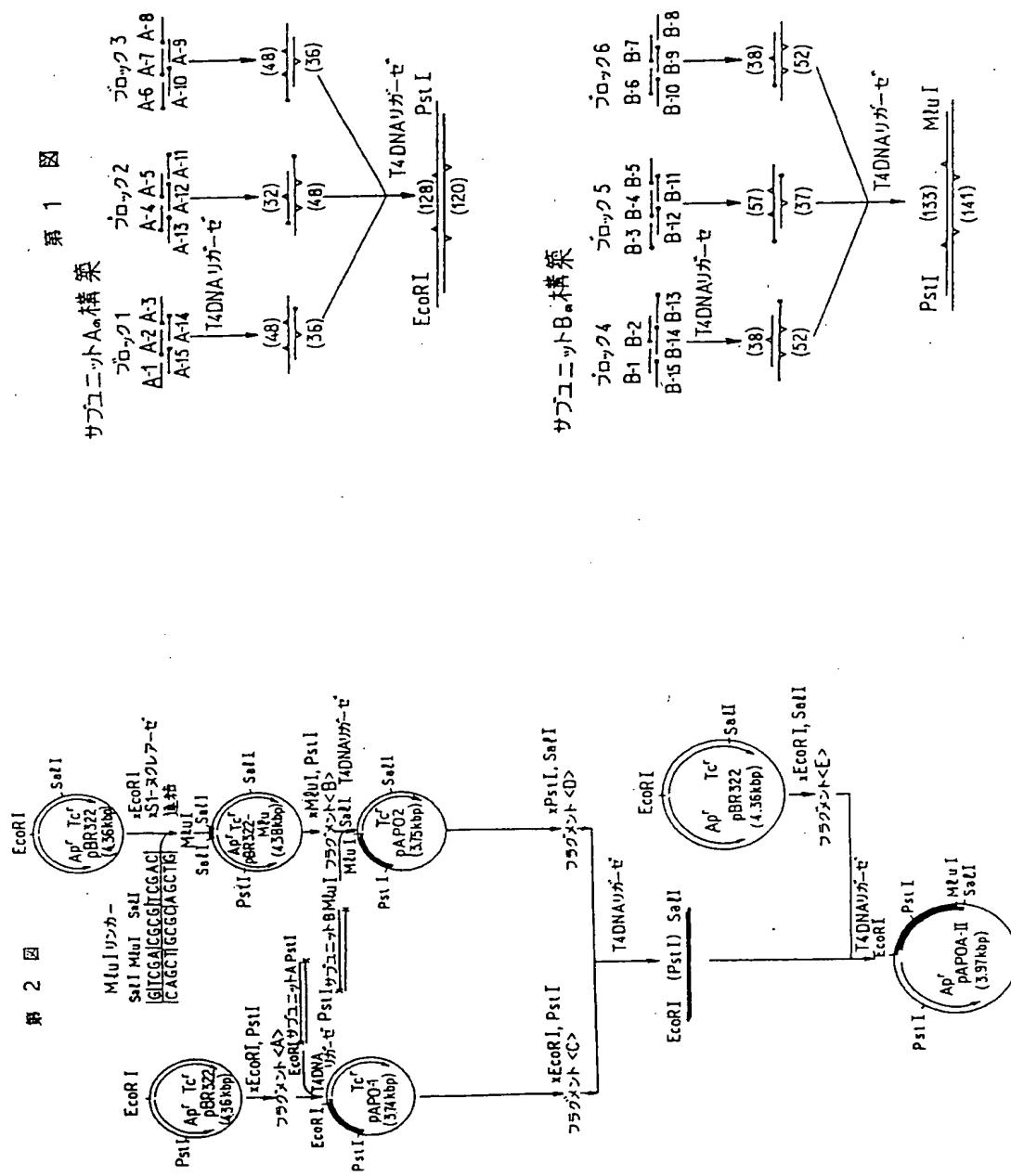
図面の簡単な説明

第1図は、本発明遺伝子を構成するサブユニットA及びサブユニットBの構造の概略を示す図である。

第2図は、pBR322からベクター-pAPO1及びpAPO2をそれぞれ構築し、また之等各ベクターからプラスミドベクター-pAPOA-IIを構築する概略図を示す。

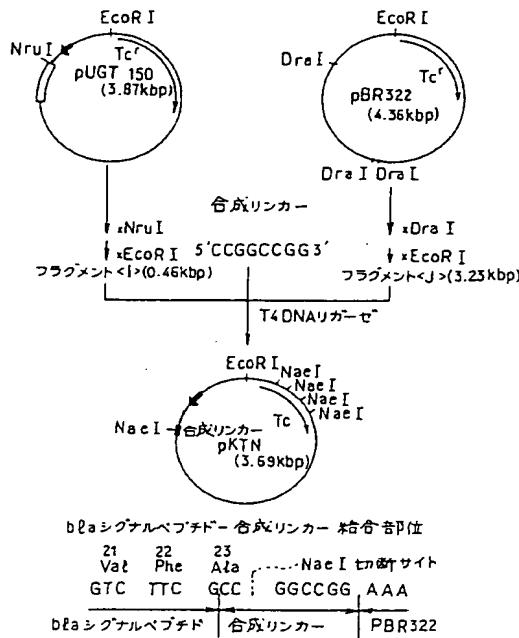
第3図はベクター-pUGT-150、合成リン

特開昭63-237795 (23)

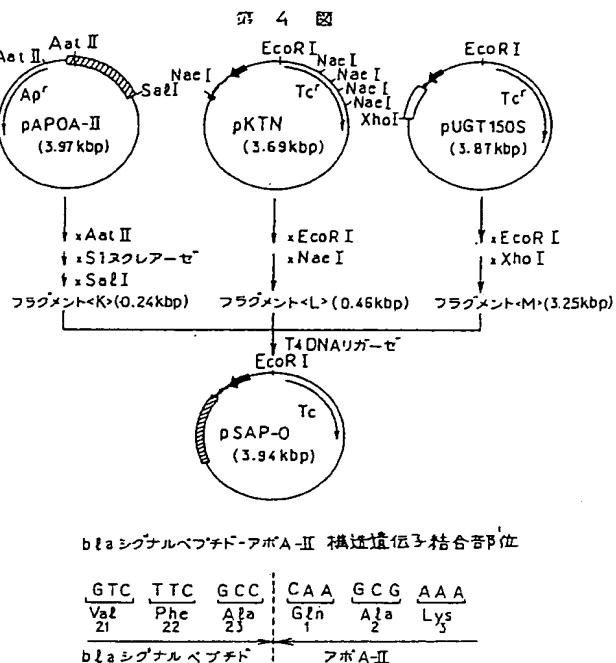


特開昭63-237795(24)

第3図



第4図



手続補正露(自発)

昭和62年5月11日

特許庁長官 黒田明雄殿

補正の内容

1 明細書第44頁第17行に「(D H 7. 5)」とあるを「(D H 7. 2)」と訂正する。

2 明細書第59頁第13行に「フォスフェート」とあるを「フォスフェート基」と訂正する。

(以上)

1 事件の表示

昭和62年特許願第71146号

2 発明の名称

アボリポタンパク質の製造法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

株式会社 大塚製薬工場

4 代理人

大阪市東区平野町2の10 淢の池ビル

(6521)弁理士 三枝英二

5 補正命令の日付

自発

6 補正の対象

明細書中「発明の詳細な説明」の項

7 補正の内容

別紙添付の通り